Aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. Dr. Ernst Schütte

Vergleichende Untersuchung zum Östradiolstoffwechsel in der normalen Brustdrüse und im Brustdrüsenkarzinom des Menschen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Joachim Baumann

Berlin

1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547205_0094

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. Dr. Ernst Schütte

Vergleichende Untersuchung zum Östradiolstoffwechsel in der normalen Brustdrüse und im Brustdrüsenkarzinom des Menschen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Joachim Baumann

Berlin

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Kunhard Pollow

Korreferent: Professor Dr. F. Neumann

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 9. September 1976

Inhaltsverzeichnis:

		Seite
1.	Einleitung	3
1.1	Ziel der Arbeit	7
2.	Material und Methoden	8
2.1.1	Steroide	8
2.1.2	Chemikalien	8
2.1.3	Gewebe	8
2.1.4	Puffermedien	9
2.2	Subzelluläre Fraktionierung	9
2.2.1	Kerne	1o
2.2.2	Mitochondrien, Peroxisomen, Lysosomen	1o
2.2.3	Präparation der submitochondrialen Fraktionen	11
2.2.4	Mikrosomen	11
2.2.5	Langzeit-Zentrifugation des Cytoplasmas	12
2.3	Bestimmung der Enzymaktivitäten	14
2.3.1	Inkubationsansatz für den oxidativen Reaktionsschritt	14
2.3.2	Inkubationsansatz für den reduktiven Reaktionsschritt	14
2.3.3	Inkubation	14
2.3.4	Steroid-Extraktion	14
2.3.5	Chromatographie	15
2.3.6	Radioaktivitätsmessung	15
2.3.7	Identifizierung der Reaktionsprodukte	16
2.4	Leitenzyme	17
2.5	Protein-, DNS-, RNS-Bestimmung	17
3.	Ergebnisse	17
3.1	Radiodünnschichtchromatographie	17
3.2	Subzelluläre Verteilung	19
3.3.1	Abhängigkeit der 17ß-HSD-Aktivität von der Zyklusphase	24
3.3.2	Vergleich von normalem und neoplastischem Mammagewebe	25

		Seite
3.4	Charakterisierung der 17β-HSD	28
3.4.1	Zeitabhängigkeit	28
3.4.2	Proteinkonzentration	29
3.4.3	Temperatur-Optimum	3o
3.4.4	pH-Optimum	31
3.4.5	Metallionen, Chelatbildner und SH-Gruppen blockierende Substanzen	32
3.4.6	K_m-Werte	33
4.	Diskussion	34
5.	Zusammenfassung	41
6.	Literatur	44
7.	Lebenslauf	6o

1. Einleitung

Die weibliche Brustdrüse ist ein klassisches Beispiel für die hormonale Regulation von Wachstum, geweblichen Differenzierungsprozessen und sekretorischen Funktionen.

Die hormonalen Signale, die auf die weibliche Brustdrüse einwirken, sind komplex zusammengesetzt. Das Spektrum reicht von den Proteohormonen wie Insulin, Wachstumshormon und Prolaktin bis zu den hochaktiven, niedrigmolekularen Steoridhormonen mit den Östrogenen, dem Progesteron, den Corticosteroiden sowie Androgenen (1-24).

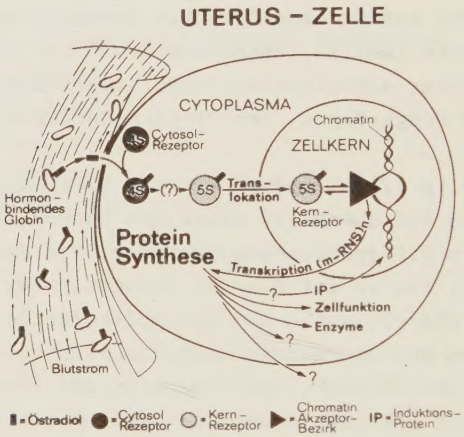
Breit angelegte in vivo - und in vitro - Untersuchungen erlaubten Einblicke in die durch die einzelnen Hormonklassen induzierten spezifischen Differenzierungsprozesse. Von den Proteohormonen ist bekannt, daß im definierten Inkubationsmilieu der Zellkultur Insulin und Prolaktin auf die Epithelzelle der Brustdrüse einen starken proliferativen Stimulus ausüben (13,13,25,26). Darüber hinaus ist bekannt, daß Prolaktin und Insulin die Synthese von Casein und Laktose, wichtigen Bestandteilen der Milch, stimulieren (27-35).

In vitro - Untersuchungen mit dem hochpotenten östrogenen Hormon Östradiol-17ß zeigten, daß dieses Hormon die insulinabhängige Proliferation der Epithelzelle der weiblichen Brustdrüse konzentrationsabhängig zu inhibieren bzw. zu stimulieren imstande ist (36-39).

Die molekularen Mechanismen, die zur Proteohormonwirkung im Targetorgan Brustdrüse führen, basieren auf der von Sutherland (4o-42) entwickelten Modellvorstellung der Blockierung bzw. Aktivierung der plasmamembrangebundenen Adenyl-Zyklase.

Die Adenyl-Zyklase katalysiert als "first messenger" die Synthese von zyklischem AMP, das als "second messenger", vom Syntheseort entfernt, durch Aktivierung von Proteinkinasen in den intermediären Zellstoffwechsel eingreift.

Die Vorstellungen zum molekularen Wirkungsmechanismus der Steroidhormone, allen voran Östradiol, gehen auf Untersuchungen von Jensen und Mitarbeiter (43-116) zurück, die vor ca. 15 Jahren initiiert wurden und sind in der folgenden Abbildung zusammengefaßt:



Mit freundlicher Genehmigung aus der Habilitationsschrift von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. K. Pollow (172).

Östradiol wird als lipophile Substanz im wäßrigen System Blut an hormonbindendes Globulin gekoppelt zur Erfolgsorganzelle (Epithelzelle der Brustdrüse) transportiert. Nach Durchwandern der Plasmamembran der Targetzelle bildet Östradiol-17ß mit einem cytoplasmatischen Rezeptormolekül einen Komplex, der nach Modifikation in den Zellkern penetriert und im Zellkern mit der genetischen Substanz, dem Chromatin, in Wechselwirkung tritt. Daraus resultiert - über den Umweg einer wie auch immer gearteten Änderung physikalisch-chemischer Zustände am Chromatin - das

Signal für die Erhöhung von Matrizenaktivität des Chromatins, für die Einleitung oder Beendigung von Transskriptionsprozessen und für die Stimulierung der Biosynthese der heterogenen nuklearen RNS, die die Vorstufe der Matrizen-RNS ist. Am Ende der Wirkungskette steht die Neubildung von Proteinen.
Das cytoplasmatische Rezeptormolekül ist charakterisiert durch hochaffine und niedrigkapazitive Bindungseigenschaften (K_D-Wert = 10^{-9} - 10^{-10} Mol/l).

Außerdem bindet der Steroidhormonrezeptor substratspezifisch (z.B. werden am Östrogenrezeptor ausschließlich biologisch aktive Östrogene - natürliche oder synthetische - gebunden).

Dieses Konzept der Steroidhormonrezeptoren erwies sich in seiner Anwendung auf die Brustdrüse, vor allem auf das Mammacarcinom des Menschen, also eines Tumors, der sich in einem ursprünglich hormonsensiblen Organ entwickelt, als außerordentlich fruchtbar. Östrogenrezeptoranalysen, die in zunehmender Zahl in letzter Zeit in Mammacarcinomen des Menschen von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt wurden (58-93), zeigten, daß Patientinnen,deren Tumoren rezeptorlos sind, keine oder kaum eine Chance haben, auf eine endokrine Therapie mit einer Remission des Tumors zu reagieren, während dies bei den rezeptortragenden Tumoren durchaus der Fall ist.

Dieser Befund mündete in eine Theorie ein, die von McGuire und Mitarbeiter (117-122) folgendermaßen zusammengefaßt wurde:

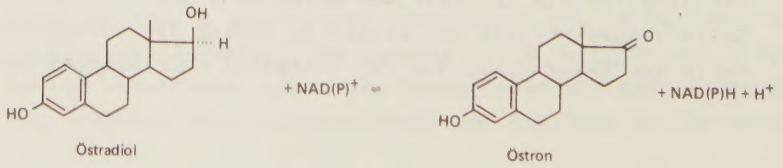
1. Normale Mammazellen enthalten Östrogenrezeptoren, die Wachstum und Funktion der Brustdrüse beeinflussen. Diese Rezeptoren sind für die initiale Wechselwirkung des Hormons mit der Zelle verantwortlich und stehen am Anfang der biochemischen Kette der Ereignisse, die für Östradiol charakteristisch sind.

2. Bei der malignen Transformation kann die Zelle die gesamte oder nur einen Teil der normalen Östrogenrezeptorpopulation behalten. Falls die Zelle die Rezeptoren behält, kann sie potentiell in Wachstum und Funktion durch die hormonale Umgebung wie eine normale Zelle reguliert werden. Gehen die Östrogenrezeptoren der Zelle im Gefolge der malignen Transformation jedoch verloren, so wird die Zelle von den zirkulierenden Hormonen nicht länger als Zelle eines Erfolgsorgans erkannt, und eine endokrine Kontrolle ist hinfällig geworden.

Obwohl den östrogenen Hormonen als stark proliferativen Substanzen und im Zusammenhang damit dem Östrogenrezeptormechanismus eine bedeutende Rolle als ätiologische Faktoren bei der Mammacarcinomentstehung zugesprochen wird, ist bis heute wenig über den Östradiol-Stoffwechsel in der normalen bzw. der neoplastisch veränderten Mammazelle bekannt.

Die folgende Untersuchung hat zum Ziel, das Schlüsselenzym des Östradiol-Stoffwechsels, die 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase, vergleichend in nichtpathologisch veränderten Mammazellen des Menschen und im Mammacarcinom zu charakterisieren.

Die Funktion der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17ß-HSD) liegt in der Katalyse der Oxidoreduktion an C 17 des Steroidkörpers von Östradiol.



Östradiol Östron

Beim oxidativen Reaktionsschritt wird Östradiol-17ß in das biologisch weniger aktive Östron transformiert, d.h., durch diesen Vorgang kann dem intrazellulären Kreislauf biologisch aktives Östradiol entzogen werden. Es könnte also über die 17ß-HSD eine Kontrolle der Dauer und Intensität der Östradiol-Wirkung durch Inaktivierung des Hormons im Erfolgsorgan selbst erfolgen. Da außerdem auf Grund von Untersuchungen am Uterus, dem klassischen Erfolgsorgan der Östrogene, bekannt ist, daß Östron und Östradiol mit unterschiedlicher Affinität am Östrogenrezeptor gebunden werden (123), ist denkbar, daß über die 17ß-HSD eine Regulation der Östradiol-"Rezeptoraktivität" erfolgen kann.

1.1 Ziel der Arbeit

Im einzelnen erstrecken sich die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit

1. auf die subzelluläre Verteilung der 17ß-HSD in Normalgewebe der weiblichen Brustdrüse, wobei mit Hilfe komplizierter Verfahren der Differentialzentrifugation hochgereinigte subzelluläre Fraktionen hergestellt werden;
2. auf die Abhängigkeit der 17ß-HSD von der Zyklusphase, also dem endogenen hormonalen Milieu im Gesamtorganismus und
3. auf einen Vergleich der spezifischen 17ß-HSD-Aktivität zwischen Normalgewebe und Mammacarcinom derselben Brustdrüse.
4. Außerdem werden die in den einzelnen subzellulären Fraktionen sich verteilenden 17ß-HSD durch enzymkinetische Parameter charakterisiert.

2. Material und Methoden

2.1.1 Steroide:

4-^{14}C-Östradiol-17ß (spez. Akt. 58 mCi/mmol) und 4-^{14}C-Östron (spez. Akt. 50 mCi/mmol) wurden von "The Radiochemical Centre" (Amersham, England) erworben und auf radiochemische Reinheit durch Kieselgel-Dünnschicht-Chromatographie geprüft. Als Laufmittel diente Benzol-Methanol 19:1 (Vol./Vol.). Der Reinheitsgrad lag zwischen 97-99 %. Alle Referenzsteroide waren handelsübliche Präparate.

2.1.2 Chemikalien

NAD^+, NADH, $NADP^+$, NADPH, DNS (Thymus), RNS (Hefe), ADP, Hexokinase, Succinat, Cytochrom-c (Rind), Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase, α-Oxoglutarat: Biochemica Boehringer, Mannheim, Deutschland
Triton X-100: Serva, Heidelberg, Deutschland
Rinderserumalbumin: Behring, Marburg, Deutschland
Lubrol WX: I.C.I. Organics Inc., Frankfurt, Deutschland
Sephadex G-200, Ficoll Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
Saccharose, CsCl, ÄDTA, Triäthanolamin, alle Lösungsmittel und die übrigen Chemikalien wurden von E. Merck, Darmstadt, Deutschland, bezogen. Die organischen Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert. Alle verwendeten Reagenzien und Substanzen waren von p.a. Reinheitsgrad.

2.1.3 Gewebe:

Insgesamt wurden 43 Carcinomproben und eine entsprechende Anzahl nichtpathologischer Gewebsproben aus der gleichen Brustdrüse untersucht. Die Gewebsproben wurden nach Mastektomie entnommen und

nach Waschen in kaltem 0,01 M Tris/HCl Puffer, pH 7,4 , dem 0,25 M Saccharose zugesetzt war, von Fettgewebe und nekrotischem Material weitgehend befreit.

Jeweils ein Teil der Gewebsproben wurde histologisch untersucht, der andere Teil zur Bestimmung der 17ß-HSD-Aktivität verwendet. Bei Prämenopausenpatientinnen (insgesamt 35 Fälle) wurde die Zyklusphase durch histologische Untersuchung des Endometriums nach Strichkürettage in Anlehnung an die Methode von Noyes et al. (124) datiert.

2.1.4 Puffermedien:

Medium A: 1 mM ÄDTA, 12 mM Merkaptoäthanol, 0,25 M Saccharose, 20 % Glycerin (Vol./Vol.), 0,01 Tris/HCl Puffer, pH 7,4

Medium B: 2,4 M Saccharose, 1 mM Magnesiumacetat, 0,01 M Tris/HCl Puffer, pH 7,4

Medium C: 25 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 24 mM Thioglycerin, 0,25 M Saccharose, 0,25 % Triton X-100 (Vol./Vol.), 0,01 M Tris/HCl Puffer, pH 7,4

2.2 Subzelluläre Fraktionierung

Alle Einzelschritte der Fraktionierung erfolgten bei 4° C. Das gewaschene Gewebe wurde gewogen, mit 4-fachem Volumen Medium A versetzt und in einem Glashomogenisator mit Teflonstempel (Potter Elvehjem) homogenisiert.

Das Homogenat wurde durch vier Gaze-Lagen filtriert und wie folgt fraktioniert:

2.2.1 Kerne:

Die Kerne wurden bei 850 x g für 10 min (Rotor SS-34 Sorvall RC-2) sedimentiert.

Die Reinigung des Kernniederschlages erfolgte durch Zentrifugation über Medium B für 60 min bei 60 000 x g (Rotor SW 25,2 , Beckman, Ultrazentrifuge L2-65 B). Das Sediment wurde in Medium A zweimal gewaschen (Reinigungsschritt I und II in Tabelle 5) und dann in Medium C suspendiert und über Medium D (2,2 M Saccharose ohne Detergens) für 60 min bei 60 000 x g zentrifugiert. Der so gewonnene Niederschlag wird als "gereinigte Kernfraktion" bezeichnet.

2.2.2 Mitochondrien, Peroxisomen und Lysosomen:

Der 850 x g Überstand wurde für 20 min bei 9 000 x g zentrifugiert, der Niederschlag durch Homogenisieren mit einem Ganzglas-Handhomogenisator in Medium A resuspendiert und für 15 min bei 9 000 x g zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde wiederholt. Das Sediment der letzten Zentrifugation wird als "gewaschene Mitochondrien" bezeichnet.

Die gewaschene Mitochondrienfraktion wurde durch Ficoll-Gradientenzentrifugation (Ficoll-Gradiente 0-15 %, Gew./Vol., in Medium A, 2,4 M Saccharose; Rotor SW 25,2 , 7 000 Upm für 15 min) nach der Methode von Brown (125) in Mitochondrien, Peroxisomen und Lysosomen separiert.

Die endgültige Reinigung der Fraktionen erfolgte durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation (20-60 %, Gew./Vol., 30 000 Upm für 4 h, Rotor SW 65 Beckman).

2.2.3 Präparation der submitochondrialen Fraktionen:

Durchführung nach Parsons et al. (126).
Die Fraktion der gewaschenen Mitochondrien wurde in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,4 , suspendiert, dem 0,02 % (Gew./Vol.) Rinderserumalbumin zugefügt worden war; anschließend bei 4° C für 20 min inkubiert und dann für 20 min bei 35 000 x g zentrifugiert.

Dies ergab als Niederschlag lysierte Mitochondrien. Der Überstand entsprach der Intermembranfraktion.

Der Niederschlag lysierter Mitochondrien wurde im Handhomogenisator mit 2 Teilen destillierten Wassers suspendiert und bei 0°C für 2 min mit Ultraschall behandelt (4 x für 30 s , Bronson sonifier, 20 KHz). Die so behandelten Mitochondrien wurden mit dem nicht-ionischen Detergens Lubrol WX versetzt (Konzentration 0,05 mg Detergens/mg Mitochondrienprotein), bei 4°C für 20 min inkubiert und nach der Methode von Yago et al. (127) durch Differentialzentrifugation fraktioniert.

Die nicht aufgebrochenen Mitochondrien wurden für 15 min bei 12 000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde für 60 min bei 105 000 x g zentrifugiert. Als Niederschlag ergaben sich die "inneren Membranstrukturen". Der 105 000 x g Überstand wurde dann für 75 min bei 155 000 x g zentrifugiert, um die "äußeren Membranstrukturen" zu sedimentieren. Der Überstand enthielt die Matrix.

2.2.4 Mikrosomen:

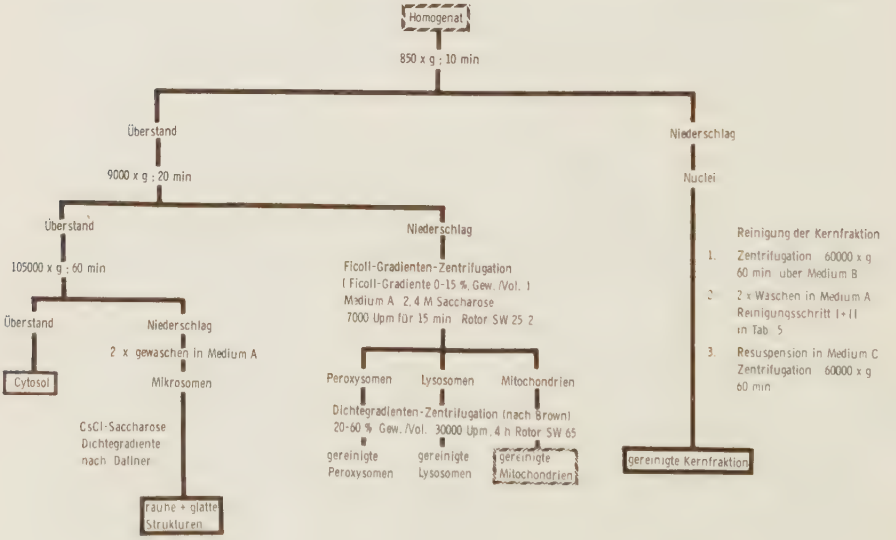
Die Mikrosomen wurden aus dem 9 000 x g Überstand durch Zentrifugation bei 105 000 x g für 60 min (Rotor 30, Beckman)gewonnen und zweimal in Medium A gewaschen.

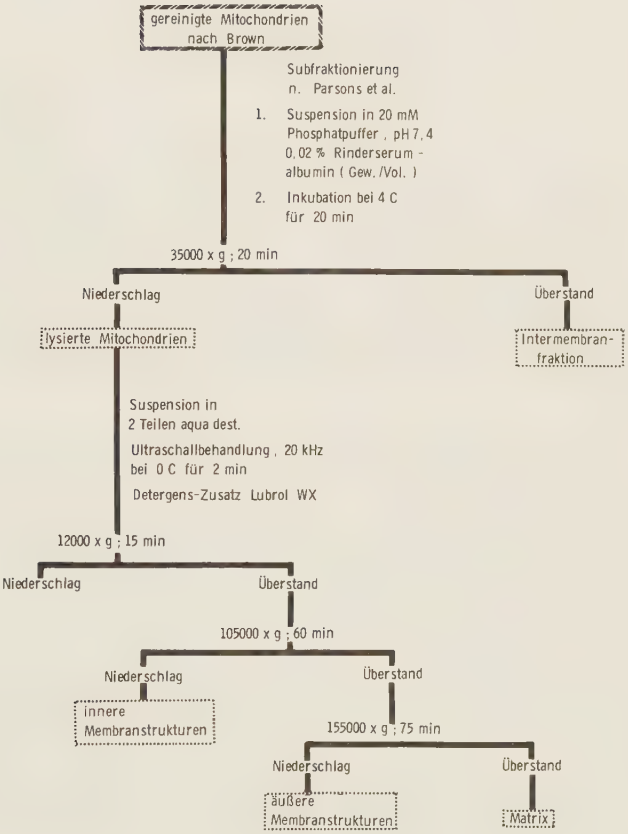
Die Separierung in glatte und rauhe Strukturen erfolgte nach der Methode von Dallner et al. (128) durch CsCl-Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation.

2.2.5 Langzeit-Zentrifugation des Cytoplasmas:

Das Cytoplasma (der 105 000 x g Überstand) wurde 1:4 mit 0,01 M Tris/HCl Puffer, pH 7,4 , verdünnt, der 20 % Glycerin (Vol./Vol.) enthielt, und dann für 30 h bei 158 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, der Niederschlag in 0,01 M Tris/HCl, 20 % Glycerin (Vol./Vol.), aufgenommen.

Schematische Zusammenfassung der subzellulären Fraktionierung:




gereinigte Mitochondrien nach Brown
Subfraktionierung n. Parsons et al.
1. Suspension in 20 mM Phosphatpuffer , pH 7,4 0,02 % Rinderserum - albumin (Gew./Vol.)
2. Inkubation bei 4 C für 20 min
35000 x g ; 20 min
Niederschlag
Überstand
lysierte Mitochondrien
Intermembran-fraktion
Suspension in 2 Teilen aqua dest.
Ultraschallbehandlung , 20 kHz bei 0 C für 2 min
Detergens-Zusatz Lubrol WX
12000 x g ; 15 min
Niederschlag
Überstand
105000 x g ; 60 min
Niederschlag
Überstand
innere Membranstrukturen
155000 x g ; 75 min
Niederschlag
Überstand
äußere Membranstrukturen
Matrix

2.3 Bestimmung der Enzymaktivitäten:

17ß-HSD-Aktivität

2.3.1 Die Standardinkubationsbedingungen für den oxidativen Reaktionsschritt waren:

0,01 M Tris/HCl Puffer, pH 7,4 , 0,1 uCi (4-^{14}C)-Östradiol-17ß (0,47 ug) unter Zusatz von 10 uM nicht radioaktiv-markierten Steroids, gelöst in 0,1 ml Propandiol (2,4 %; Vol./Vol.), 500 uM NAD^+ und Enzympräparation; Gesamtvolumen 4,1 ml.

Enzympräparation (mg Protein/0,5 ml) :

3,5 mg Cytoplasma, 5 mg Mikrosomen, 1,2 mg Mitochondrien, 0,7 mg Peroxisomen, 0,4 mg Lysosomen, 1,8 mg Kerne und 0,25 - 0,6 mg submitochondriale Strukturen.

2.3.2 Der Inkubationsansatz des reduktiven Reaktionsschrittes bestand aus:

0,15 M Phosphatpuffer, pH 6,0 , 0,1 uCi (4-^{14}C)-Östron unter Zusatz von 10 uM nicht radioaktiv-markierten Steroids, gelöst in 0,1 ml Propandiol, und 500 uM NADH + H^+.

2.3.3 Inkubation:

Die Inkubationstemperatur betrug 37°C. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Coenzyme gestartet und nach 30 min durch Einbringen in Eiswasser beendet; danach Extraktion der lipophilen Substanzen mit je 5 ml Äther/Chloroform 15:1 (Vol./Vol.).

2.3.4 Steroid-Extraktion:

Die Äther/Chloroform-Extrakte (3 x 5 ml) wurden vereint und unter Stickstoff zur Trockne eingeengt; der trockene Rückstand

wurde in 0,5 ml Benzol gelöst und in einem aliquot (50 ul) wurde die Gesamtradioaktivität durch Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt (Berthold BF 5 000 Flüssigkeitsszintillationszähler, Wildbad, Deutschland).

2.3.5 Chromatographie:

Anschließend wurde die benzolische Lösung unter Stickstoff zur Trockne eingeengt, der Rückstand in 0,2 ml Chloroform/Methanol 1:1 (Vol./Vol.) aufgenommen und zur Separierung der Metabolite einer Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel aufsteigend im geschlossenen System im Laufmittel Benzol/Methanol 19:1 (Vol./Vol.) unterworfen (Kieselgel F_{254} , 0,25 mm, Woelm, Eschwege, Deutschland). Die Reaktionsprodukte, Standardlösungen nicht markierter Steroide und (4-^{14}C)-Östradiol-17ß liefen parallel.

2.3.6 Radioaktivitätsmessung:

Die Radioaktivität der separierten Steroide wurde routinemäßig abgeschätzt mit einem Radiodünnschicht-Scanner (LB 2723 Berthold, Wildbad, Deutschland) unter Verwendung eines fensterlosen Methan-Durchflußzählers mit 2π-Zählgeometrie und gleichzeitiger Integration der Substanzgipfel mit dem Berthold-Integrationsschreiber. Die Zählausbeute für (^{14}C) wurde mit ca. 18 % ermittelt. Die Auswertung erfolgte in pmol gebildeten Produktes pro mg Protein pro min Inkubationsdauer.

Der Prozentsatz der Radioaktivität jeder Probe wurde aus der Anfangsradioaktivität des (^{14}C) Substrates geschätzt.

Die Lokalisation der radioaktiven Steroide erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzabsorption gleichzeitig chromatographierter nicht-markierter Steroide.

2.3.7 Identifizierung der Reaktionsprodukte:

Die Radioaktivitätsgipfel, die mit authentischen Referenzsubstanzen R_F-Wert identisch mit Östradiol und Östron chromatographierten, wurden von der Platte abgeschabt und mit 5 ml Aceton in konische Zentrifugengläschen eluiert. Das Aceton wurde unter Stickstoff zur Trockne eingeengt, der Rückstand in 1 ml Methanol gelöst und wie folgt verarbeitet:

a 400 ul wurden nach der Methode von Zaffaroni und Burton (129) acetyliert. Die Reaktionsprodukte wurden mit authentischen Referenzsubstanzen auf Dünnschichtplatten in einem Cyclohexan/Äthylacetat-System 1:1 (Vol./Vol.) chromatographiert.

b 400 ul der methanolischen Lösung wurden mit Chromsäure nach Liebermann et al. (130) oxidiert, die Oxidationsprodukte mit authentischen Referenzsubstanzen auf Dünnschichtplatten im Laufmittel Benzol/Äthylacetat 8:2 (Vol./Vol.) chromagraphiert.

c Zur weiteren Identifizierung wurden etwa 200 ul der Produkte zur konstanten spezifischen Aktivität umkristallisiert (Tabelle 1).

	Losungsmittel	Spezifische Radioaktivitat (dpm/mg Östron) Mutterlauge	Kristalle
Ausgangsmaterial		6318	-
1. Umkristallisation	Äther	6012	6021
2. "	Chloroform/n-Heptan	5935	6008
3. "	Essigester/n-Heptan	5943	5978
Errechnete spez. Aktivitat		-	5912

Tabelle 1: Identifizierung von Östron durch Umkristallisation aus verschiedenen Lösungsmitteln zur konstanten spezifischen Aktivität

2.4 Leitenzyme:

Die Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase wurde nach der Methode von Bücher et al. (131); die Succinat-Dehydrogenase nach Arrigoni und Singer (132); die Uratoxidase nach Mahler et al. (133); die Monoaminooxidase und die Adenylatkinase nach Schnaitman et al. (134); die saure Phosphatase nach Leighton et al. (135) und die Glutamat-Dehydrogenase nach Bergmeyer (136) bestimmt.

2.5 Protein-DNS-RNS-Bestimmung

Die Proteinmenge wurde nach der Methode von Lowry et al. (137) mit einem Rinderserumalbumin-Standard gemessen, der DNS-Gehalt wurde nach dem Ansatz von Burton (138) mit einem DNS-Standard aus Kalbsthymus, der RNS-Gehalt aus einem RNS-Standard aus Hefe nach Ceriotti (139) ermittelt.

3. Ergebnisse:

3.1 Radiodünnschicht-Chromatographie

Nach Inkubation unter Standardbedingungen von 10 uM (4-^{14}C)-Östradiol-17ß mit Homogenat sowie mit verschiedenen subzellulären Fraktionen aus nichtmalignem Mammagewebe des Menschen ergaben sich nach Dünnschicht-Chromatographie der Äther/Chloroform-Extraktion der Reaktionsansätze zwei Radioaktivitätsgipfel.

Abbildung 1 zeigt als Beispiel ein typisches Radiodünnschichtchromatogramm des Östradiol-17ß-Metabolismus in der Mikrosomenfraktion aus nichtmalignem Mammagewebe von Prämenopausenpatientinnen der frühen sekretorischen Phase.

Nichtumgesetztes Östradiol repräsentierte den höchsten Radioaktivitätsanteil, der relativ kleinere Gipfel stellte entstandenes Östron dar. Das Metabolitenspektrum nach Inkubation von Proben aus Mammacarcinomen entsprach dem von normalem Mammagewebe (nicht dargestellt).

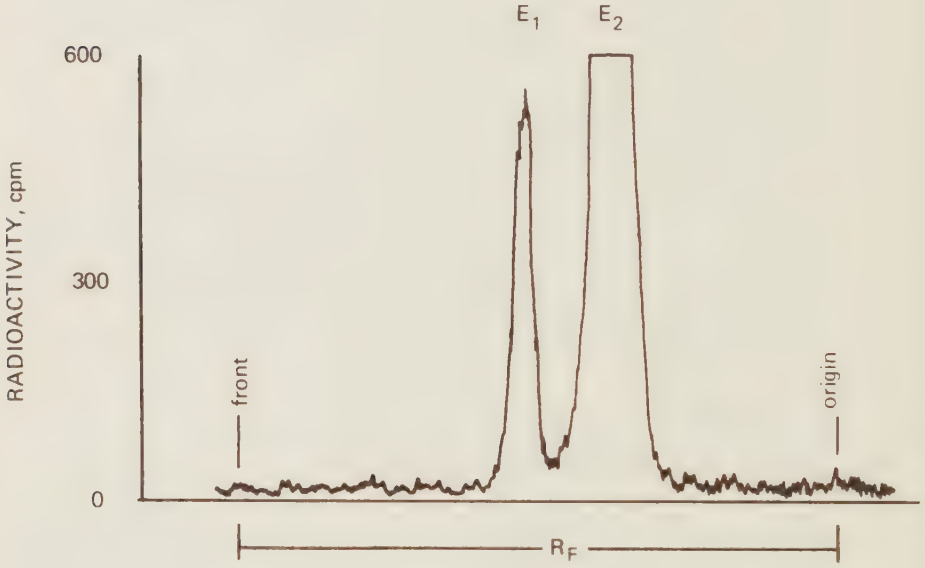


Abbildung 1
Radiodünnschicht-Chromatogramm von (4-^{14}C)-Östradiol-Metaboliten. Inkubationsbedingungen: 0,01 M Tris/HCl Puffer, pH 7,4 , 0,1 uCi (4-^{14}C)-Östradiol-17ß (0,47 ug) unter Zusatz von nicht radioaktiv markiertem Steroid (Endkonzentration 10 uM), gelöst in 0,1 ml Propandiol (2,4 %, Vol./Vol.), 500 uM NAD^+ und Enzympräparation; Gesamtvolumen 4,1 ml. Inkubiert wurde für 30 min bei 37°C unter Luftzutritt.
Chromatographie erfolgte aufsteigend im geschlossenen System im Laufmittel Benzol/Methanol 19:1 (Vol./Vol.) auf Kieselgelplatten. E_1 = Östron, E_2 = Östradiol

Die eindeutige Identifizierung von Östron erfolgte durch mikrochemische Reaktionen und durch Umkristallisation nach dem Verfahren der umgekehrten Isotopenverdünnung.

Der im Laufmittel Benzol/Methanol mit Östron als authentischer Referenzsubstanz R_F-Wert identisch chromatographierende Östradiol-Metabolit zeigte nach Oxidation und Acetylierung keine Änderung seiner chromatographischen Eigenschaften, was für ein Fehlen von Hydroxylgruppen am Steroidskelett spricht.

3.2 Subzelluläre Verteilung:

Tabelle 2 zeigt die Verteilung der 17ß-HSD und der Leitenzyme in den subzellulären Fraktionen von normalem Mammagewebe des Menschen.

Subzellular-fraktion	Protein		Glukose-6-P-DH		Succinat-DH		Saure Phosphatase		Urat-oxidase		NADPH-Cytochrom-c-Reduktase		17ß-HSD	
	mg	%	S.A.	%	S.A.	%	S.A.	%	S.A.	%	S.A.	%	S.A.	%
Homogenat	1581	100	248	100	287	100	3058	100	213	100	881	100	158,6	100
Mitochondrien	258	16,3	n.m.	-	227	79,1	158	5,2	18	8,5	11	1,3	87,4	55,1
Lysosomen	14	2,8	n.m.	-	30	10,5	2778	90,8	23	10,8	n.m.	-	8,3	5,2
Peroxysomen	49	3,1	n.m.	-	19	6,6	211	6,9	178	83,6	n.m.	-	5,4	3,4
Mikrosomen	195	12,3	n.m.	-	n.m.	-	n.m.	-	n.m.	-	808	97,7	40,0	25,2
Cytoplasma	724	45,8	211	85	n.m.	-	n.m.	-	n.m.	-	n.m.	-	5,7	3,6
Kerne	210	13,3	n.m.	-	n.m.	-	n.m.	-	n.m.	-	n.m.	-	1,8	3,0
Wiederfindung		93,6		85,0		96,2		102,9		102,9		99,0		95,6

Tabelle 2: Intrazelluläre Verteilung von Leitenzymen und der 17ß-HSD in Mammagewebe des Menschen
S.A. = spezifische Enzymaktivität (pmol/mg Protein/ min) n.m. nicht meßbar

Die 17ß-HSD-Aktivität war hauptsächlich mit der Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion assoziiert. Die Aktivität im Cytoplasma, in der Peroxisomen-, der Lysosomen- und der gereinigten Kernfraktion betrug 1/10 bis 1/20 der in der Mitochondrien- bzw. Mikrosomenfraktion gemessenen Werte.

Wie die Verteilung der Leitenzyme zeigt, war der Reinheitsgrad der subzellulären Fraktionen, gewonnen durch Differentialzentrifugation, ausreichend. Eine vollständige Separierung der Mitochondrien von den Lysosomen, Peroxisomen und Mikrosomen gelang nicht, aber der Anteil der extramitochondrialen Fremdenzym-Aktivität ist als relativ gering anzusehen. Die Lysosomenfraktion war geringgradig durch Mitochondrien und Peroxisomen verunreinigt; der Reinheitsgrad der Peroxisomen und Mikrosomen war ausreichend.

Um zu entscheiden, ob die in der Cytoplasmafraktion lokalisierte 17ß-HSD-Aktivität ein echtes lösliches Enzym oder ein membrangebundenes Enzym ist, das an Partikel niedriger spezifischer Dichte, die bei 105 000 x g nicht sedimentieren, assoziiert ist, wurde die Cytoplasmafraktion nach 4-facher Verdünnung mit 0,01 M Tris/HCl, 20 % Glycerin (Vol./Vol.) bei 158 000 x g für 30 h zentrifugiert (Tabelle 3).

Fraktion	Gesamtaktivität (pmol/min)	Gesamtprotein (mg)	Spezif.Akt.der 17ß-HSD (pmol/mg Protein/min)
Cytoplasma	578	101,4	5,7
Niederschlag (30 h, 158000 x g)	140	26,4	5,3
Überstand (30 h, 158000 x g)	417	77,2	5,4

Tabelle 3: Einfluß einer Langzeit-Zentrifugation (30 h, 158 000 x g) auf die cytoplasmatische 17ß-HSD-Aktivität von Humanmammagewebe nach 4-facher Verdünnung mit 0,01 M Tris/HCl Puffer, pH 7,4

Im Überstand wurde keine Änderung der spezifischen Aktivität der 17ß-HSD beobachtet. Weiterhin konnte in dem Niederschlag keine Aktivität der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase als Leitenzym des endoplasmatischen Retikulums festgestellt werden. Eine elektronenoptische Untersuchung ergab feingranulierte Strukturen wie sie von Fawceff (140) und Palade, Siekevitz (141) bei Hochgeschwindigkeitszentrifugationssedimenten des Lebercytoplasmas beschrieben wurden (nicht dargestellt). Es ist deshalb wahrscheinlich, daß Langzeitzentrifugation zur Sedimentation der 17ß-HSD in Form von Enzymaggregaten geringer Dichte führte. Eine solche Aggregation wurde für die lösliche 17ß-HSD von Humanplacenta (142) und Endometrium (143) beschrieben.

Mit Hilfe der Methode von Dallner und Ernster (144) wurde eine Separierung der glatten und rauhen Mikrosomen erzielt. Die glatten Strukturen erscheinen in der Zwischenzone, die rauhen Strukturen sedimentieren durch die 1,3 M Saccharose-Schicht zu einem Niederschlag.

Fraktion	Zone	17ß-HSD (pmol/mg Protein/min)
Gewaschene Mikrosomen		40
0,25 M Saccharose	1	3,8
Glatte Strukturen (Zwischenzone 0,25/1,3M Sacch.)	2	38,2
1,3 M Saccharose	3	1,2
Rauhe Strukturen (Niederschlag in 1,3M Sacch.)	4	40,8

Tabelle 4: Spezifische 17ß-HSD-Aktivität in gewaschenen Mikrosomen und mikrosomalen Subfraktionen von Mammagewebe des Menschen. Die Fraktionierung der gewaschenen Mikrosomen in glatte und rauhe Strukturen erfolgte nach der Methode von Dallner et al. (144) durch CsCl-Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation.

Tabelle 4 zeigt, daß die spezifische Aktivität der 17ß-HSD in den glatten und rauhen Mikrosomen der in zweimal gewaschenen nativen Mikrosomen analog ist. Daraus folgt, daß die mikrosomale 17ß-HSD an die Membranen des endoplasmatischen Retikulums gebunden ist.

Die Reinheit der Kernfraktionen, die durch konventionelle Differentialzentrifugation aus Mammahomogenat des Menschen hergestellt wurden, wurde morphologisch durch Phasenkontrast-Mikroskopie und chemisch durch Vergleich der RNS/DNS und Protein/DNS-Quotienten überprüft. Nach drei Reinigungsschritten lagen der RNS/DNS-Quotient bei 0,2 und der Protein/DNS-Quotient bei 2. (Tabelle 5).

	RNA/DNA	Protein/DNA	17 ß - H S D- Aktivität pmol/mg DNA/ min	pmol/mg Protein/ min
Kernniederschlag Reinigungsschritt I	0,29±0,08	2,01±0,07	14,3	7,1
Kernniederschlag Reinigungsschritt II	0,25±0,05	1,98±0,03	10,3	5,2
Gereinigte Kernfraktion	0,23±0,03	1,95±0,02	9,4	4,8
	n=6	n=6	n=6	n=6

Tabelle 5: Chemische Zusammensetzung und 17ß-HSD-Aktivität von Kernen aus Mammagewebe des Menschen nach verschiedenen Reinigungsschritten.
Einzelheiten vergleiche "Material und Methoden".
n = Anzahl der Fälle

Die dem Kern assoziierte 17ß-HSD-Aktivität nahm während des Reinigungsvorganges ab.

Um die Verunreinigung der Mitochondrien mit der Mikrosomenfraktion abzuschätzen, wurde die Aktivität des mikrosomalen Leitenzyms NADPH-Cytochrom-c-Reduktase nach mehreren Reinigungsschritten in den Mitochondrien bestimmt und mit der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase-Aktivität der Mikrosomenfraktion aus demselben Gewebe verglichen (Tabelle 6)

Subzelluläre Fraktion	Anzahl der Waschvorgänge	NADPH-Cytochrom-c-Reduktase	Mikrosomale Verunreinigung (%)	17ß-HSD
Mitochondrien	2	11	1,4	87,4
	3	n.m.	1	82,8
	4	n.m.	1	87,4
Mikrosomen	2	808	-	46

Tabelle 6: Spezifische Aktivität der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase und der 17ß-HSD (pmol/mg Protein/min) in mehrfach gewaschenen Mitochondrien und in Mikrosomen von Mammagewebe des Menschen

Die spezifische Aktivität der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase in der zweimal gewaschenen Mitochondrienfraktion verringerte sich von anfänglich 11 pmol/mg Protein/min auf weniger als 1 % mikrosomale Verunreinigung der Mitochondrienfraktion nach viermaligem Waschen.

	Succinat-DH	Monoamino-oxidase	Adenylat-kinase	Glutamat-DH	17ß-HSD
Gewaschene Mitochondrien	227	113	158	987	87,4
Außenmembranen	87	641	298	n.m.	278
Innenmembranen	682	n.m.	n.m.	211	45,3
Intermembranfraktion	n.m.	n.m.	1112	148	n.m.
Matrix	n.m.	n.m.	n.m.	2113	n.m.

Tabelle 7: Spezifische Aktivitäten (pmol/mg Protein/min) von Leitenzymen und der 17ß-HSD in gereinigten Subfraktionen von Mitochondrien aus Mammagewebe des Menschen. Einzelheiten siehe "Material und Methoden" n.m. = nicht meßbar

Tabelle 7 zeigt die Verteilung der Leitenzyme und der 17ß-HSD Aktivität in gereinigten Subfraktionen gewaschener Mitochondrien von Mammagewebe des Menschen.

Es ergibt sich, daß sich die 17ß-HSD in den submitochondrialen Fraktionen verteilt wie das Leitenzym der Außenmembranen, die Monoaminooxidase. Die löslichen Subfraktionen (Matrix, Intermembranfraktion) waren nicht imstande, Östradiol zu Östron zu oxidieren.

3.3.1 Abhängigkeit der 17ß-HSD-Aktivität von der Zyklusphase

Abbildung 2 zeigt, daß die spezifische Aktivität der 17ß-HSD aus normalem Mammagewebe von Praemenopausen-Patientinnen von der menstruellen Zyklusphase abhängig ist.

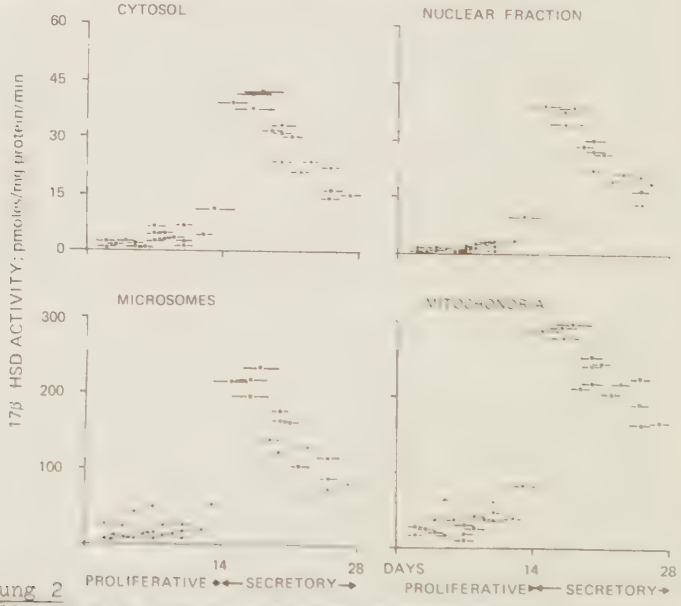


Abbildung 2
Abhängigkeit der mitochondrialen, mikrosomalen, cytoplasmatischen und nuklearen 17ß-HSD-Aktivität von der Zyklusphase.
Die Punkte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen; die horizontalen Linien zeigen die Streubreite des histologisch festgestellten Zykluszeitpunktes. Einzelheiten vergleiche "Material und Methoden".

Dies zeigt sich besonders bei den in partikulären Strukturen von Mitochondrien und Mikrosomen gebundenen 17ß-HSD: Die Umsetzung von Östradiol-17ß zu Östron war in den subzellulären Fraktionen aus der frühen sekretorischen Phase weit höher als in denen, die der Proliferationsphase entnommen waren.

3.3.2 Vergleich von normalem und neoplastischem Mammagewebe:

Die Umsatzraten von Östradiol-17ß zu Östron in verschiedenen subzellulären Fraktionen aus Mammacarcinomgewebe verglichen mit Normalgewebe derselben Brustdrüse sind in Abbildung 3 zusammengefaßt.

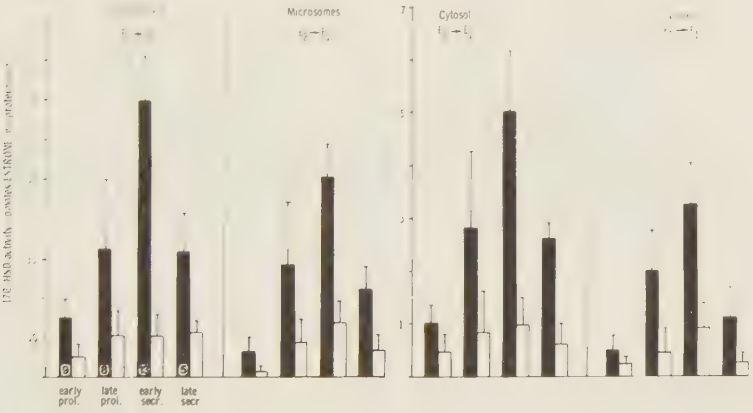


Abbildung 3
Östradioloxidation in verschiedenen subzellulären Fraktionen von normalem Mammagewebe (schwarze Balken) verglichen mit Mammacarcinomen (gepunktete Balken) aus derselben Brustdrüse. Inkubationsansatz: Vergleiche "Material und Methoden".

Die Balken entsprechen Mittelwerten ± Standardabweichung (vertikale Linien); die in den Säulen angegebene Zahl entspricht der Anzahl der Fälle.

early prol. = frühe Proliferationsphase (1. - 7. Zyklustag)
late prol. = späte Proliferationsphase (8. - 13. Zyklustag)
early secr. = frühe Sekretionsphase (14. - 21. Zyklustag)
late secr. = späte Sekretionsphase (22. - 28. Zyklustag)

In allen Proben zeigte das Normalgewebe einen größeren Umsatz von Östradiol zu Östron als das neoplastische Gewebe. Diese Tendenz blieb auch erhalten, wenn Östron als Substrat (reduzierende Reaktionsbedingungen) verwendet wurde (Abbildung 4).

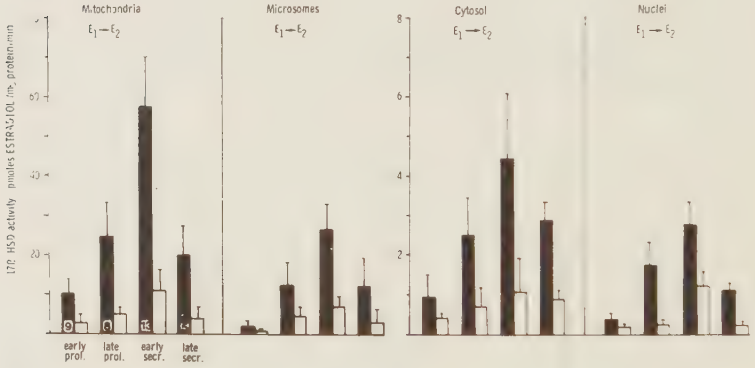


Abbildung 4

Östronreduktion in verschiedenen subzellulären Fraktionen von normalem Mammgewebe (schwarze Balken) verglichen mit Mammacarcinomen (gepunktete Balken) aus derselben Brustdrüse. Inkubationsansatz: Einzelheiten vergleiche "Material und Methoden".

Außerdem wurden Proben normalen und neoplastischen Gewebes von 13 Patientinnen der Postmenopause untersucht (Abbildung 5).

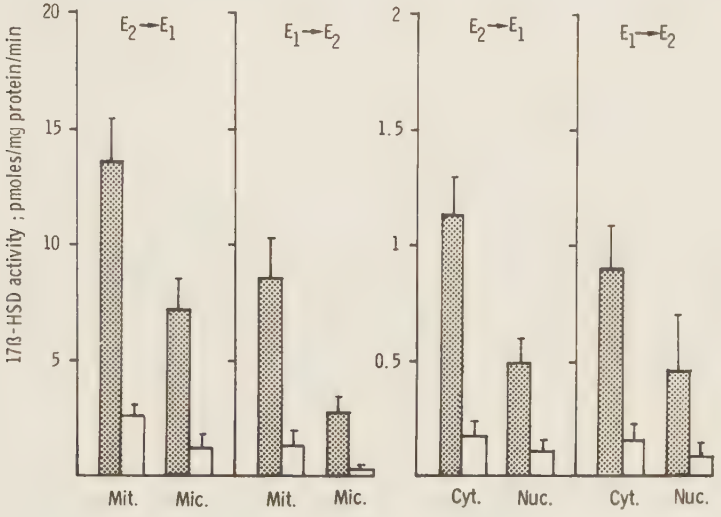


Abbildung 5

Spezifische Aktivität der 17β-HSD in verschiedenen subzellulären Fraktionen aus normalem und neoplastischem Gewebe derselben Brustdrüse von Postmenopausen-Patientinnen. Inkubationsbedingungen siehe "Material und Methoden".

In allen Gewebsproben wurde 17ß-HSD-Aktivität gefunden, aber zu einem geringeren Prozentsatz als im prämenopausalen Gewebe. Abbildung 5 zeigt weiterhin, daß alle Proben von normalem Mammagewebe des Menschen eine höhere 17ß-HSD-Aktivität als irgendeine Mammacarcinomprobe aufwiesen.

3.4 Charakterisierung der 17ß-HSD:

3.4.1 Zeitabhängigkeit:

Die Umwandlung von Östradiol in Östron in verschiedenen subzellulären Fraktionen aus Normalmammagewebe des Menschen in Abhängigkeit von der Zeit ist in Abbildung 6 dargestellt. Bis zu 60 min war der Anstieg linear; deshalb wurde die Standardinkubationsdauer mit 30 min festgelegt.

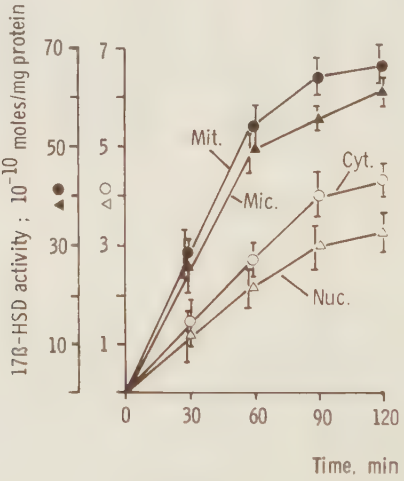
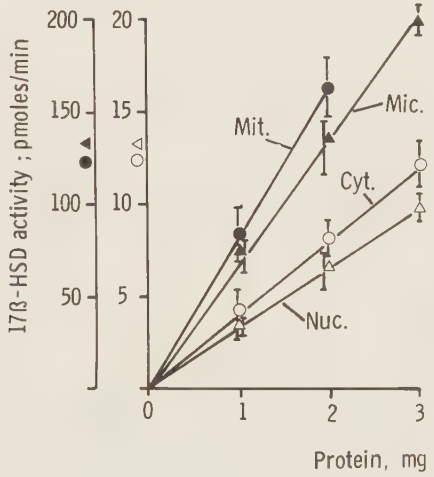


Abbildung 6

Östradioloxidation in Abhängigkeit von der Zeit in verschiedenen subzellulären Fraktionen von normalem Mammagewebe des Menschen. Standardinkubationsbedingungen siehe Legende zu Abb. 7

3.4.2 Proteinkonzentration:

Abbildung 7 zeigt den Einfluß der Enzymkonzentration (mg Protein/4,1 ml Reaktionsansatz) auf die Umwandlung von Östradiol-17ß zu Östron. Die Reaktion war bis zu 3 mg Enzymprotein/Inkubationsansatz linear.



Abbilung 7

Anfangsgeschwindigkeit der 17ß-HSD in verschiedenen subzellulären Fraktionen von normalem Mammagewebe des Menschen als Funktion der Proteinkonzentration.

Inkubationsbedingungen: 0,01 M Tris/HCl Puffer, pH 7,4 ; 0,1 uCi (4-^{14}C)-Östradiol-17ß (0,47 ug) unter Zusatz von nicht radioaktiv markiertem Steroid (Endkonzentration 10 uM), gelöst in 0,1 ml Propandiol (2,4 %, Vol./Vol.), 500 uM NAD^+ und Enzympräparation; Gesamtvolumen 4,1 ml. Inkubiert wurde für 30 min bei 37^{o}C unter Luftzutritt.

3.4.3 Temperatur-Optimum:

Das Temperatur-Optimum der Oxidation von Östradiol-17ß zu Östron in den verschiedenen subzellulären Fraktionen lag bei 40°C (Abbildung 8).

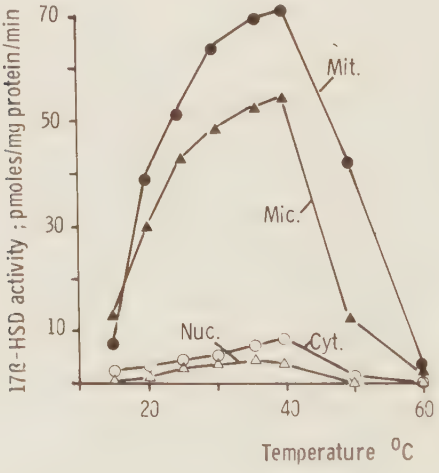


Abbildung 8
Einfluß der Temperatur auf die Östradiol-Oxidation in verschiedenen subzellulären Fraktionen von normalem Mammagewebe des Menschen.
Standardinkubationsbedingungen siehe Legende zu Abb. 7

3.4.4 pH-Optimum:

In Abbildung 9 wird die Abhängigkeit der 17ß-HSD von der Wasserstoffionenkonzentration dargestellt. Für den oxidativen Reaktionsschritt wurde ein pH-Optimum von 9,5 ermittelt (0,01 M Tris/HCl Puffer), für den reduktiven Reaktionsschritt lag das pH-Optimum bei pH 6,5 (0,15 M Phosphatpuffer).

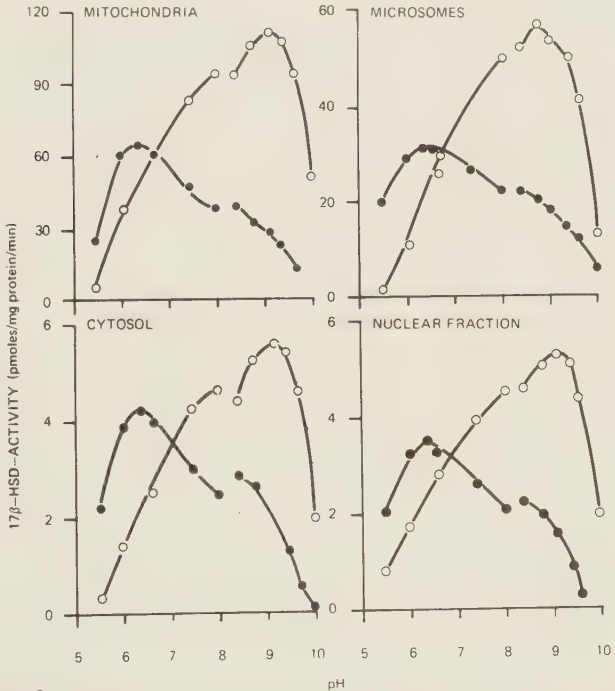


Abbildung 9
Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration und der Zusammensetzung des Puffermediums auf die 17ß-HSD-Aktivität in verschiedenen subzellulären Fraktionen von normalem Mammagewebe des Menschen.
Standardinkubationsbedingungen siehe Legende zu Abb. 7

3.4.5 Metallionen, Chelatbildner und SH-Gruppen blockierende Substanzen:

Der Einfluß von Metallionen, SH-Gruppen-blockierenden Substanzen und ÄDTA auf die 17ß-HSD-Aktivität in verschiedenen subzellulären Fraktionen des Menschen ist in Tabelle 8 zusammengefaßt.

		17ß - Hydroxysteroid - Dehydrogenase			
	Konzentration (M)	Cytoplasma (%)	Mitochondrien-fraktion (%)	Mikrosomen-fraktion (%)	Kern-fraktion (%)
ohne Zusatz	-	100	100	100	100
p-Chlormercuri-benzoat	10^{-3}	12	8	18	12
Jodacetamid	10^{-3}	48	52	47	63
ÄDTA	10^{-3}	78	88	84	71
Cystein	10^{-3}	108	98	102	94
Zn^{2+}	10^{-5}	68	54	62	51
	10^{-3}	14	12	8	9
Mn^{2+}	10^{-5}	94	88	91	98
	10^{-3}	88	72	78	71
Cu^{2+}	10^{-3}	-	-	-	-
Fe^{2+}	10^{-3}	45	38	32	24

Tabelle 8

Der Einfluß von Metallionen, Chelatbildnern und SH-Gruppen-blockierenden Substanzen auf die 17ß-HSD-Aktivität verschiedener subzellulärer Fraktionen von normalem Mammagewebe des Menschen.

Sulfhydroxylgruppen-blockierende Substanzen übten einen starken inhibitorischen Effekt aus, ebenso Metallionen bei einer Konzentration von 10^{-3} M.

3.4.6 K_m-Werte:

Die Michaelis-Konstanten und Maximalgeschwindigkeiten (V) der in den einzelnen subzellulären Fraktionen von normalem und neoplastischem Mammagewebe lokalisierten 17ß-HSD wurden bei konstantem Proteingehalt mit variabler Östradiol-Konzentration als Substrat in Gegenwart von NAD^+ bzw. $NADP^+$ entsprechend dem Verfahren von Lineweaver und Burk durch doppelt reziproke Auftragung graphisch ermittelt und sind in Tabelle 9 dargestellt.

Enzympräparation	konstante Coenzymkonzentration (10 uM)	K_m für Östradiol (uM) A	B	C	Maximalgeschwindigkeit (pmol/mg Protein/min) A	B	C
Cytoplasma	NAD^+	0,71	0,69	0,88	3,8	12,3	1,8
	$NADP^+$	1,13	1,08	-	1,7	3,8	-
Mikrosomenfraktion	NAD^+	0,61	0,57	0,73	21,7	108,0	14,7
	$NADP^+$	1,23	1,18	-	8,3	24,3	-
Mitochondrienfraktion	NAD^+	0,81	0,80	1,03	33,8	132,0	11,3
	$NADP^+$	1,02	1,05	-	14,7	25,3	-
Kernfraktion	NAD^+	1,14	1,06	1,18	2,5	8,7	0,7
	$NADP^+$	1,53	1,48	-	0,8	2,1	-

Tabelle 9
K_m-Werte und V der 17ß-HSD in verschiedenen subzellulären Fraktionen aus normalem Mammagewebe des Menschen (konstante Coanzym-Konzentration, variable Östradiol-Konzentration). Die Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Inkubationsbedingungen siehe"Material und Methoden".

A= Mammagewebe von geschlechtsreifen Frauen der frühen Proliferationsphase
B= Mammagewebe von geschlechtsreifen Frauen der frühen Sekretionsphase
C= Gewebsproben aus Mammacarcinomen von Prämenopausenpatientinnen der frühen sekretorischen Phase (die carcinomatösen Gewebsproben wurden aus denselben Brustdrüsen wie in B entnommen).

4. Diskussion:

Seit Östrogenrezeptoren im Mammagewebe des Menschen dargestellt wurden, hat das Wissen über den Östradiol-Metabolismus der Brustdrüse eine entscheidende Bedeutung erlangt, denn es könnte in diesem Gewebe

1. eine Metabolitenbildung mit folgender Kompetition von Östradiol-17ß und seinen Metaboliten um Bindungsstellen am Steroidrezeptor erfolgen und
2. könnten Steroidanomalitäten in Zusammenhang mit der Entstehung des Adenocarcinoms der weiblichen Brustdrüse stehen.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die subzelluläre Verteilung der 17ß-HSD in normalem und neoplastischem Mammagewebe zu untersuchen. Ferner sollte die Östronbildungsrate in Abhängigkeit vom endokrinen Status (Prä- und Postmenopausenpatientinnen, Abhängigkeit vom menstruellen Zykluszeitpunkt) dargestellt und die Östronausbeute zwischen Mammacarcinom und normalem Brustdrüsengewebe, das in jedem Einzelfall der gleichen carcinomtragenden Brust entnommen wurde, verglichen werden.

Bis heute ist wenig über die Biotransformation von Östradiol-17ß zu Östron in Mammagewebe des Menschen bekannt. James et. al. (145) verabreichten Mammacarcinompatientinnen ^{3}H-Östradiol-17ß parenteral; dabei identifizierten sie zwischen 3 und 50 % des extrahierbaren Steroids als ^{3}H-Östron. In jüngster Zeit berichteten Geier et al. (146) über den 4-^{14}C-Östradiol-Metabolismus in normalem und neoplastischem Mammagewebe des Menschen aus Gewebekulturen. In allen Fällen wurde Östradiol-17ß zu Östron umgesetzt; das nichtmaligne Gewebe (einschließlich Fibroadenomen und Mastopathia cystica) zeigte jedoch eine stärkere Östronbildung als die Mammacarcinomproben.

Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit denen

dieser Arbeit, in der gezeigt werden konnte, daß die 17ß-HSD aus normalem Mammgewebe des Menschen höhere spezifische Enzymaktivitätspegel aufweist als Mammacarcinomproben der gleichen Brustdrüse.
Starke Verunreinigung der hormonsensitiven Drüsenzellen durch Fettgewebe konnte durch mikroskopische Kontrolle weitgehend ausgeschlossen werden. Darüberhinaus zeigten Bleau et al. (147), daß oxidative Konversion von Östradiol-17ß zu Östron in Fettgewebe des Menschen im Bereich der unteren Nachweisgrenze liegt.
Die Untersuchungen zur subzellulären Verteilung der 17ß-HSD in normalem Mammagewebe des Menschen machen deutlich, daß das 17ß-Enzym strukturgebunden in der Mikrosomenfraktion, den Außenmembranen der Mitochondrien, dem Membransystem des endoplasmatischen Retikulums und in der Kernfraktion lokalisiert ist und als lösliche 17ß-HSD im Cytoplasma vorkommt. Die Aktivität der cytoplasmatischen und kerngebundene 17ß-HSD macht ca. 1/10 der in den Mitochondrien- und Mikrosomenmembranen gebundenen Aktivität aus. Das intrazelluläre 17ß-HSD-Verteilungsmuster in Mammagewebe ist keine für dieses Gewebe typische Eigenart, sondern entspricht dem von anderen 17ß-HSD-reichen Geweben (Placenta, Endometrium) wie Siiteri et al. (148), Pollow et al. (143) und Lehmann und Breuer (149) zeigen konnten. Der Reinheitsgrad der subzellulären Fraktionen war ausreichend, wie die Ergebnisse der Leitenzymaktivitätsbestimmung und der elektronenmikroskopischen Kontrolle der einzelnen subzellulären Fraktionen zeigen.
Das ubiquitäre Vorkommen der 17ß-HSD in der Brustdrüsenzelle deutet eine Schlüsselrolle dieses Enzyms für den Östrogenmetabolismus in diesem Targetorgan an.
Zur Charakterisierung der Eigenschaften der löslichen und membrangebundenen 17ß-HSD aus Gewebsproben von Normalmammsgewebe und Mammacarcinomen wurden kinetische Untersuchungen durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, daß die in den Cytoplasma-, Mikrosomen-, Mitochondrien- und Kernpräparationen lokalisierten 17ß-HSD-Enzyme durch ähnliche kinetische Eigenschaften und Charakterisierungsmerkmale gekennzeichnet sind.
Die K_m-Werte liegen in der gleichen Größenordnung, das bevorzugte wasserstoffübertragende Coenzym ist NAD^+, Zusätze von Sulfhydrylreagenzien übten auf alle Enzympräparationen gleichartige Wirkungen aus. Geringfügige Unterschiede in den pH- und Temperaturoptima sind wahrscheinlich durch die unterschiedliche Lokalisation der 17ß-HSD in der Zelle bedingt (z.B. störende Einflüsse auf die kinetische Parameter durch interferierende, in der Membran fixierte, Enzymsysteme, Beeinflussung durch Umgebungsstrukturen, Phospholipoide als Aktivatoren u.s.w.). Die Ähnlichkeiten in den enzymcharakterisierenden Parametern unterstützen die Annahme, daß es sich bei der löslichen und in den zellorganellen lokalisierten 17ß-HSD-Aktivität um ähnliche Enzyme, möglicherweise um das gleiche Enzym handelt. Darüberhinaus kann aus den Ergebnissen der Charakterisierungsstudien abgeleitet werden, daß die 17ß-HSD aus Mammagewebe des Menschen ähnliche enzymkinetische Eigenschaften besitzt wie die bekannten 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen anderer Gewebe, anderer Tierspecies und bakteriellen Ursprungs (150-158). Die vorliegenden Untersuchungen zeigen ferner, daß die spezifische Aktivität der 17ß-HSD aus normalem Mammagewebe des Menschen - dem 17ß-HSD-Enzym des Humanendometriums entsprechend - von der menstruellen Zyklusphase abhängig ist:
Niedrige Werte in der frühen Proliferationsphase, langsamer Anstieg der 17ß-HSD-Aktivität während der späten Proliferationsphase mit maximalen Werten zum Zeitpunkt der Ovulation und langsamer Abfall bis zum Zeitpunkt der men-struellen Abstoßung der Uterusschleimhaut.
Interessant in diesem Zusammenhang ist die Frage nach der

physiologische Funktion der 17ß-HSD-Aktivitätsschwankungen über die Zyklusphase. Es kann angenommen werden, daß ein hoher Gewebsspiegel der 17ß-HSD den durch Östradiol ausgelösten Proliferationsreiz in der Targetzelle zu blockieren vermag. Weiterhin kann die Ansprechbarkeit des Mammagewebes auf zirkulierendes Östradiol durch unterschiedliche Gewebsaktivitäten der 17ß-HSD reguliert werden: Östron und Östradiol konkurrieren kompetitiv um Bindungsstellen an den Östrogenrezeptoren des Mammagewebes. Andererseits haben Untersuchungen am Endometrium des Menschen gezeigt, daß Östron viel leichter als Östradiol aus den Zellen herausdiffundieren kann (123).

Auf Grund der bisherigen Ergebnisse ist es schwierig, die unterschiedliche Aktivitäten der 17ß-HSD während der verschiedenen Zyklusphasen zu erklären. Von Pollow (172) werden an einem anderen Targetorgan der Östrogene, dem Endometrium, folgende Regulationspothesen postuliert.

1. Änderung der räumlichen Molekülkonformation des Enzymproteins durch allosterische Effektoren,
2. Änderung der Denaturierungsrate des Enzymproteins über die Zyklusphase,
3. zyklusabhängige Synthese von Inhibitor- oder Aktivatorproteinen der 17ß-HSD. Als Inhibitorproteine könnten z.B. östradiolbindende intrazelluläre Rezeptorproteine dienen, die durch "Wegfangen" von Östradiol aus dem intrazellulären Kreislauf der Targetzelle und somit dem Enzymprotein biologisch aktives Östradiol entziehen würden. Aus Untersuchungen an Humanendometrium ist bekannt, daß in der frühen Proliferationsphase hohe Östradiolrezeptorspiegel vorliegen, also gegenüber der 17ß-HSD-Aktivität eine inverse Korrelation besteht. Dieses Phänomen könnte - vorausgesetzt die Rezeptorkonzentrationsverhältnisse liegen im Mammagewebe ähnlich - die niedrigen 17ß-HSD-Spiegel in der frühen Proliferationsphase erklären.

4. Zyklusgesteuerte Aktivierung bzw. Inaktivierung der Enzymprotein-de novo-Synthese der 17ß-HSD.

Die Übereinstimmung zwischen der hohen intrazellulären 17ß-HSD-Aktivität und der hohen Plasmakonzentration von Progesteron während der zweiten Zyklushälfte, der sog. Gelbkörperphase, deutet die Möglichkeit an, daß Progesteron, ähnlich wie im Endometrium des Menschen, über den für Steroidhormone typischen Rezeptormechanismus einen stimulierenden Effekt auf die 17ß-HSD auszuüben vermag (durch Progesteron ausgelöste de novo-Synthese von 17ß-HSD-Enzymprotein). An GEwebekulturen von Humanendometrium konnten Tseng und Gurpide (123) zeigen, daß ausschließlich Progesteronzusatz zum Inkubationsmedium eine Stimulierung der 17ß-HSD-Aktivität in der Endometriumzelle auslöste. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, daß - ähnlich wie am Endometrium - histomorphologisch faßbare Veränderungen am Brustdrüsengewebe des Menschen innerhalb des Menstruationszyklus nachgewiesen wurden, die man auf den wechselhaften Einfluß der Ovarialhormone zurückführte. Auffällig waren

1. eine optimale, vom Corpus luteum-Hormon abhängige Läppchenentwicklung im Praemenstruum,
2. eine verstärkte follikelhormonabhängige Quellung des intralobulären Stromas ab dem Praemenstruum bis zum Östrus und
3. eine teilweise Rückbildung der Läppcheneinheiten im Postmenstruum und im Östrus (159-170).

Unklar ist, zu welchem Zeitpunkt die 17ß-HSD nach Eintritt von Östradiol in die Targetzelle seine katalytische Wirkung entfaltet. Zwei Möglichkeiten bieten sich an:

1. Enzymatische Östradiol-17ß-Oxidation unmittelbar nach Eintritt von Östradiol in die Targetzelle, also vor

Bindung des Hormons durch den spezifischen cytoplasmatischen Rezeptor und

2. nachdem Östradiol über den Rezeptormechanismus seine biologische Aktivität am Targetchromatin entfaltet hat.

Bei de Hypothesen würden in jedem Falle eine wirksame Regulation der intrazellulären Östradiolwirkung ermöglichen, Der zweite Mechanismus würde verhindern, daß nach Ablösen des Östradiols vom Chromatin-Akzeptor-Bezirk und Zurückfluten in den Cytoplasmaraum das erneut an cytoplasmatische Rezeptorproteine gebundene Östradiol wiederum in den Zellkern translozieren könnte und seine biologische Wirkung am Chromatin entfaltet.

Das Zusammenwirken von hoher 17ß-HSD-Aktivität und physiologischerweise vorhandenen hohen Progesteronserumspiegeln in der zweiten Zyklushälfte könnte als synergistischer Effekt aufgefaßt werden, der zu einer wirkungsvollen Blockierung eines durch Östradiol ausgelösten proliferativen Stimulus führt. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung von besonderem Interesse, daß in allen Gewebsproben aus Mammacarcinomen die 17ß-HSD-Aktivität gering ist, d.h., der "Schutzmechanismus" gegen hohe intrazelluläre Östradiolspiegel insuffizient wird. Ob dieses Phänomen mit der Malignen Transformation, also der Ätiologie des Brustdrüsencarcinoms in Zusammenhang steht, ist zum jetzigen Zeitpunkt nur spekulativ zu beantworten. Eine Untersuchung von Horwitz und Mc Guire (171) zur Charakterisierung der cytoplasmatischen Progesteronrezeptoren an 33 Mammacarcinompatienten zeigte, daß nur in 11 Fällen Progesteronrezeptoren nachgewiesen werden konnten. Betrachtet man dieses Ergebnis unter dem Blickwinkel der Hypothese von Pollow (172) und Tseng und Gurpide (123), daß der Progesteronrezeptormechanismus verantwortlich ist für die Stimulierung bzw. de novo-Synthese der 17ß-HSD, so ließen sich die niedrigen

17ß-HSD-Aktivitäten in Mammacarcinomproben erklären. Um die vermutete positive Korrelation zwischen Progesteronrezeptormechanismus und 17ß-HSD-Aktivität zu beweisen, ist es notwendig, diese Frage an einer großen Anzahl von Fällen signifikant abzusichern. Sollte die positive Korrelation zutreffen, wäre mit der experimentell einfach durchzuführenden 17ß-HSD-Aktivitätsbestimmung im Karzinomgewebe ein diagnostisches Hilfsmittel gegeben, um eine Aussage über die Intaktheit des Progesteronrezeptormechanismus in allen seinen Punkten zu treffen. Denn die zur Zeit weltweit durchgeführte Bestimmung der Steroidhormonrezeptorkonzentration im Cytoplasma von Tumorgewebe zur diagnostischen Einordnung der Tumoren in "tumor-positiv" und "tumor-negativ" und den damit verbundenen therapeutischen Konsequenzen bietet nur eine begrenzte Aussage in Bezug auf die Intaktheit der biologischen Aktivität des Steroidhormonrezeptormechanismus. Denn der Nachweis von Steroidhormonrezeptoren im Cytosol beweist nicht, daß der cytoplasmatische Steroidhormonrezeptorkomplex in den Zellkern, den intrazellulären Wirkort, transloziert, mit dem Chromatinakzeptorbezirk assoziiert und auf der Primärebene der Transskription und der nachgeschalteten Ebene der Translokation die Synthese spezifischer Proteine (z.B. 17ß-HSD) induziert.

5. Zusammenfassung:

Trotz des starken proliferativen Effektes der östrogenen Hormone im Target-Organ Brustdrüse und ihrer sicher nicht unbedeutenden Rolle in der Ätiologie des weiblichen Mammacarcinoms ist bis heute wenig über den Östradiol-17ß-Metabolismus in normalem bzw. neoplastisch transformiertem Mammagewebe bekannt. Die vorliegende Arbeit verfolgt das Ziel, die 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17ß-HSD), das Schlüsselenzym des Östradiolstoffwechsels, in normalem und neoplastisch verändertem Mammagewebe des Menschen vergleichend zu untersuchen.

Die Untersuchung zur subzellulären Verteilung der 17ß-HSD ergab, daß das Enzym mit den partikulären Strukturen der Mikrosomenfraktion, den Außenmembranen der Mitochondrien, des endoplasmatischen Retikulums, der peroxisomalen und lysosomalen Fraktionen sowie der Kernfraktion assoziiert ist und als lösliches Enzym im Cytoplasmaraum vorkommt.

Die spezifische Aktivität der 17ß-HSD war in der Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion am höchsten (ca. 10 bis 20 mal höher als in den übrigen subzellulären Fraktionen). Der Reinheitsgrad der subzellulären Fraktionen wurde durch Bestimmung der Leitenzym-Aktivitäten charakterisiert.

Die spezifische 17ß-HSD-Aktivität stieg nach der Menstruation während der gesamten Proliferationsphase stetig an und erreichte ihr Maximum zum Ovulationstermin. Die spezifische Enzymaktivität sank während der Sekretionsphase wieder ab, wobei die Werte in der frühen sekretorischen Phase jedoch stets höher als in der Proliferationsphase blieben. Dies war in den Mitochondrien

und den Mikrosomen deutlicher als im Cytoplasma und in der Kernfraktion ausgeprägt.

Die Umsetzung von Östradiol-17ß zu Östron war in normalem Brustdrüsengewebe geschlechtsreifer Frauen immer höher als im Gewebe von Patientinnen der Postmenopause.

In der frühen und späten Proliferationsphase als auch in allen Abschnitten der Sekretionsphase war in sämtlichen subzellulären Fraktionen aus normalem Brustdrüsengewebe die 17ß-HSD-Aktivität höher als in den neoplastischen Gewebsproben, unabhängig davon, ob oxidierende oder reduzierende Reaktionsbedingungen vorlagen.

Enzymkinetische Untersuchungen zeigten, daß bis zu einer Inkubationsdauer von 60 min ein linearer Anstieg der enzymatischen Östradioloxidation in den verschiedenen subzellulären Fraktionen erfolgte.

Die Anfangsgeschwindigkeit der 17ß-HSD erhöhte sich mit Steigerung der Proteinkonzentration im Inkubationsmedium bis zu einem Wert von 3 mg Enzymprotein/Inkubationsansatz.

Das Temperaturoptimum der Östradioloxidation lag in allen subzellulären Fraktionen bei ca. 40° C.

Die optimale Wasserstoffionenkonzentration wurde für den oxidativen Reaktionsschritt bei pH 9,5 erreicht, für den reduktiven Reaktionsschritt liegt das pH-Optimum bei pH 6,5 . Die Sulfhydroxyl-Gruppen-blockierenden Substanzen p-Chlormercuribenzoat und Jodacetamid hemmten in einer Konzentration von 10^{-3} M die cytoplasmatische 17ß-HSD zu 88 % und 52 %, die strukturgebundene

17ß-HSD wurde zu 82 - 92 % und zu 48 - 53 % gehemmt. Eine starke Enzymhemmung wurde auch durch die Metallionen Zn^{2+} (92 % Hemmung der mikrosomalen 17ß-HSD), Mn^{2+} (28 % Hemmung der mitochondrialen 17ß-HSD) und Fe^{2+} (68 %Hemmung der mikrosomalen 17ß-HSD) bei einer Konzentration von 10^{-3} M bewirkt. ÄDTA zeigte keine deutliche Inhibition (22 % Hemmung der cytoplasmatischen 17ß-HSD).

Als wasserstoffübertragende Coenzyme bei der enzymatischen Oxidation von Östradiol-17ß zu Östron dienten in allen subzellulären Fraktionen NAD^+ und $NADP^+$, wobei mit NAD^+ 2 - 4 fach höhere Maximalgeschwindigkeiten (V) erzielt wurden als bei Zugabe von $NADP^+$.

Die Maximalgeschwindigkeiten der Enzympräparationen waren abhängig von deren subzellulärer Herkunft und vom Zykluszeitpunkt. Die V-Werte von Mammacarcinomproben waren niedriger als die entsprechenden Werte in normalem Brustdrüsengewebe. Die höchsten V-Werte ergaben sich bei Enzympräparationen aus Normalmammagewebe von Prämenopausenpatientinnen der frühen Sekretionsphase.

Die Michaelis-Konstanten in normalem und neoplastischem Brustdrüsengewebe unterschieden sich nicht signifikant (ca. 1×10^{-6}M).

6. Literatur

1. Bangham, A.D., Standish, M.M. und G. Weissman:
J. Mol. Biol. 13 (1965) 253.

2. Bresciani, F.
Cell Tissue Kinetics 1 (1968) 51.

3. Chatterton, R.T. jr.
In "Sex Steroids: Molecular Mechanisms"
(K.W. Mc Kerns, ed.), im Druck, Appleton, New York

4. Chatterton, R.T., jr., Chatterton, A.J. und L. Hellman
Endocrinology 85 (1969) 16.

5. De Duve, C., Wattiaux, R. und M. Wibo
Biochem. Pharmacol. 9 (1961) 97.

6. De Wulf, H. und H.G. Hers
European J. Biochem. 6 (1968) 558.

7. Gold, A.H.
J. Biol. Chem. 245 (197o) 9o3.

8. Mersmann, H.J. und H.L. Segal
J. Biol. Chem. 244 (1969) 17o1.

9. Prop, F.J.A.
Nature 184 (1959) 379.

1o. Prop, F.J.A.
Exp. Cell Res. 2o (196o) 256.

11. Prop, F.J.A.
Pathol. Biol. Semaine Hop. 9 (1961) 64o.

12. Prop, F.J.A.
Exptl. Cell Res. 42 (1966) 386.

13. Prop, F.J.A. und S.E.A. Hendrix
Exptl. Cell. Res. 4o (1965) 277.

14. Stockdale, F.E. und Y.J. Topper
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 56 (1966) 1283.

15. Stockdale, F.E., Jürgens, W.G. und Y.J. Topper
Develop Biol. 13 (1966) 266.

16. Turkington, R.W.
Endocrinology 82 (1968) 54o.

17. Turkington, R.W.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 41 (197o) 1362.

18. Turkington, R.W.
In "The Sex Steroids: Molecular Mechanisms"
(K.W. Mc Kerns, ed.) im Druck, Appleton, New York

19. Turkington, R.W. und M. Riddle
J. Biol. Chem. 245 (197o) 5145.

2o. Turkington, R.W. und M. Riddle
Cancer Res. 3o (197o) 65o.

21. Turkington, R.W. und Y.J. Topper
Endocrinology 8o (1967) 329.

22. Turkington, R.W., Jürgens, W.G. und Y.J. Topper
Endocrinology 8o (1967) 1139.

23. Weissman, G.
Biochem. Pharmacol. 14 (1965) 525.

24. Weissman, G. und L. Thomas
Recent Progr. Hormone Res. 2o (1964) 215.

25. Rivera, E.M.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 116 (1964) 568.

26. Rivera, E.M. und R.A. Bern
Endocrinology 69 (1961) 34o.

27. Brew, K., Vanaman, T.C. und R.L. Hill
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 5o (1968) 491.

28. Grota, L.J. und K.B. Eik-Nes
J. Reprod. Fertility 13 (1967) 83.

29. Lockwood, D.H., Turkington, R.W. und Y.J. Topper
Biochem. Biophys. Acta 13o (1966) 493.

3o. Turkington, R.W., Lockwood, D.H. und Y.J. Topper
Biochem. Biophys. Acta 148 (1967) 475.

31. Turkington, R.W. und R. Hilf
Science 16o (1968) 1457.

32. Turkington, R.W.
Endocrinology 82 (1968) 575.

33. Turkington, R.
Exptl. Cell Research 58 (1969) 296.

34. Turkington, R.W. und R.L. Hill
Science 163 (1969) 1458.

35. Turkington, R.W. und O.T. Ward
Biochem. Biophys. Acta 174 (1969) 291.

36. Baird, T.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 28 (1968) 244.

37. Korenman, S.G., Perrin, L.E. und T.P. Mc Callum
J. Clin. Endocrinol. Metab. 29 (1969) 879.

38. Turkington, R.W.
Experientia 24 (1968) 226.

39. Turkington, R.W.
In "Developmental Aspects of the Cell Cycle"
I.L. Cameron, G.M. Padilla und A.M. Zimmerman, eds.)
S. 315 Academic Press, New York.

4o. Sutherland, E.W. und T.W. Rall
Pharmacol. Rev. 12 (196o) 265.

41. Sutherland, E.W., Rall, T.W. und T. Menon
J. Biol. Chem. 237 (1962) 122o.

42. Sutherland, E.W., Øye, I. und R.W. Butcher
Recent Progr. Hormone Res. 21 (1965) 623.

43. Anderson, J.,Clark, J.H. und E.J. Peck
Biochem. Biophys. Res. Commun. 48 (1972) 146o.

44. Arnaud, M., Beziat, Y., Guillex, J.C., Hough, D.,
und M. Mousseron-Canet
Biochem. Biophys. Acta 232 (1971) 117.

45. Baulieu, E.E., Alberga,A., Jung, I., Lebeau, M.C., Mercier Bodard, C., Milgrom, E., Raynaud, J.P., et. al., Raynaud-Jammet, C., Rochefort, H., Troung, H. und P. Robel
Rec. Progr. Horm. Res. 27 (1971) 263.

46. Braunsberg, H., Irvine, W.T. und V.H.T. James
Brit. J. Cancer 21 (1967) 714.

47. Braunsberg, H., James, V.H.T., Irvine, W.T., James, F., Jamieson, C.W., Sellwood, R.A., Carter, A.E. und M. Hulbert
Lancet 1 (1973) 163.

48. Brooks, W.F., jr., und J.L. Wittliff
Anal. Biochem. 54 (1973) 464.

49. Chawness, G.C., Jennings, A.W. und W.L. Mc Guire
Nature 241 (1973) 458.

5o. Demetriou, J.A., Crowley, L.G., Kushinski, S., Donovan, A.J., Kotin, B. und I. Mac Donald
Cancer Res. 24 (1964) 926.

51. Deshpande, N., Jensen, V., Bulbrook, R.D., Berne, T. und F. Ellis
Steroids 1o (1967) 219.

52. Desombre, E.R., Puca, G.A. und E.V. Jensen
Proc. Natn. Acad. Sci. USA 64 (1969) 148.

53. Erdos, T.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 32 (1968) 338.

54. Fang,S., Anderson, K.M. und S. Liao
J. Biol. Chem. 244 (1969) 6584.

55. Feherty, P., Farrer-Brown, G. und A.E. Kellie
Brit. J. Cancer 25 (1971) 697.

56. Fenel, M.M. und C.A. Villee
Endocrinology 88 (1971) 279.

57. Folca, P.J., Glascock, R.F. und W.T. Irvine
Lancet 2 (1961) 796.

58. Gardner, D.G. und J.L. Wittliff
Brit. J. Cancer 27 (1973) 441.

59. Gardner, D.G. und J.L. Wittliff
Biochem. Biophys. Acta 32o (1973) 617.

6o. Gardner, D.G. und J.L. Wittliff
Biochemistry 12 (1973) 3o9o.

61. Gorlich, M. und E. Heise
Arch. Geschwulstforsch. 38 (1971) 139.

62. Gorski, J., Toft, D., Shyamala, G., Smith, D. und A. Notides
Recent Progr. Horm. Res. 24 (1968) 45.

63. Hahnel, R. und E. Twaddle
Steroids 18 (1971) 653.

64. Hamilton, T.H.
Science 161 (1968) 649.

65. Hilf, R.
Nat. Cancer Inst. Monogr. 34 (1971) 43

66. Hilf, R.
Methods Cancer Res. 7 (1973) 55.

67. Hilf, R., Goldenberg, H. Michel, I., Carrington, M.J., Bell, C., Gruenstein, M., Meranze, D.R. und M.B. Shimkim
Cancer Res. 29 (1969) 977.

68. Hilf, R., Goldenberg, H., Orlando, R.A. und F.L. Archer
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 132 (1969) 613.

69. Hilf, R., Goldenberg, H., Bell, C., Michel, I., Orlando, R.A. und F.L. Archer
Enzymol. Biol. Clin. 11 (197o) 162.

7o. Jensen, E.V.
Proc. Int. Congr. Biochem., 4th, Vol. 15 (196o) 119.

71. Jensen, E.V. und E.R. De Sombre
In "Biochemical Actions of Hormones" (G. Litwack ed.) Vol. 2 S. 215 Academic Press, New York

72. Jensen, E.V. und E.R. De Sombre
Annu. Rev. Biochem. 41 (1972) 2o3.

73. Jensen, E.V. und H.I. Jacobson
In "biological Activities of Steroids in Relation to Cancer" (G. Pincus und E.P. Vollmer, eds.) S. 161 (196o) Academic Press, New York.

74. Jensen, E.V. und H.I. Jacobson
Recent Progr. Horm. Res. 18 (1962) 387.

75. Jensen, E.V., De Sombre, E.R. und P.W. Jungblut
In "Endogenous Factors Influencing Host-Tumor Balance" (R.W. Wissler, T.L. Dao und S. Wood, eds.) (1967) S. 15 Univ. of Chicago Press, Chicago, Illinois.

76. Jensen, E.V., Suzuki, T., Kawashima, T., Stumph, W.E., Jungblutm P.W. und E.R. De Sombre
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 59 (1968) 632.

77. Jensen, E.V., Block, G.E., Smith, S., Kyser, K. und E.R. De Sombre
Nat. Cancer Inst. Monogr. 34 (1971) 55.

78. Jensen, E.V., Block, G.E., Smith, S., Kyser, K. und E.R. De Sombre
In "Estrogen Target Tissues and Neoplasia" (T.L. Dao ed.) (1972) S. 23 Univ. of Chicago Press, Chicago, Illinois.

79. Johansson, H., Terenius, L. und L. Thoren
Cancer Res. 3o (197o) 692.

8o. Jensen, E.V., Hurst, D.J., De Sombre, E.R. und D.W. Jungblut
Science 158 (1967) 385.

81. Jensen, E.V.
Proceedings of 2nd International Congress on Endocrinology S. 42o Experta Medica, New York, International Congress Series No. 83 (1965)

82. King, R.J.B. und J. Gordon
J. Endocr. 34 (1966) 431.

83. King, R.J.B. und J. Gordon
Nature New Biol. 24o (1972) 185.

84. Korenman, S.G. und B.A. Dukes
J. Clin. Endocrinology Metab. 3o (197o) 639.

85. Korenman, S.G. und B.R. Rao
Proc. Natn. Acad. Sci. USA 61 (1968) 1o28.

86. Leung, B.S., Fletcher, W.S., Lindell, T.D., Wood, D.C. und W.W. Krippaehne
Arch. Surg. (Chicago) 1o6 (1973) 515.

87. Maass, H., Engel, B., Hohmeister, H., Lehmann, F. und G. Trams
Amer. J. Obstet. Gynecol. 113 (1972) 377.

88. Mc Guire, W.L. und M. De La Garza
J. Clin. Endocrinol. Metab. 36 (1973) 548.

89. Mohla, S., De Sombre, E.R. und E.V. Jensen
Biochem. Biophys. Res. Commun. 46 (1972) 661.

9o. Mueller, G.C.
In "Mechanisns of Hormone Acton" (P. Karlson, ed.) (1965) S. 228 Academic Press, New York

91. Mueller, G.C., Vonderhaar, B., Kim, U.H. und M.L. Mahieu
Rec. Progr. Horm. Res. 28 (1972) 1.

92. Nesset, B.L., Shih, Y.H. und R.J. Brown
Fed. Proc. 25 (1966) 19o.

93. O Malley, B.W., Sherman, M.R. und D.O. Toft
Proc. Natn. Acad. Sci. 67 (197o) 5o1.

94. Pearlman, W.H., De Hertogh, R., Laumas, K.R. und M.R.J. Pearlman
J. Clin. Endocrinol. Metabol. 29 (1969) 7o7.

95. Puca, G.A. und F. Bresciani
Endocrinology 85 (1969) 1.

96. Rochefort, H. und E.E. Baulieu
Endocrinology 84 (1969) 1o8.

97. Ruh, T.S., Katzenellenbogen, B.S., Katzenellenbogen, J.A. und J. Gorski
Endocrinology 92 (1973) 125.

98. Segal, S.J., Davidson, O.W. und K. Wada
Proc. Natn. Acad. Sci. USA 54 (1965) 782.

99. Sherman, M.R., Corvol, P.L. und B.W. O Malley
J. Biol. Chem. 245 (197o) 6o85.

1oo. Sander, S.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 74 (1968) 3o1.

1o1. Shyamala, G. und J. Gorski
J. Biol. Chem. 244 (1969) 1o97.

1o2. Shyamala, G.
Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 32 (1973) 453.

1o3. Shyamala, G. und S. Nandi
Endocrinology 91 (1972) 861.

1o4. Smith, J.A. und R.J.B. King
Cancer Res. 3o (197o) 2o55.

1o5. Stancel, G.M., Leung, K.M.T. und J. Gorski
Biochemistry 12 (1973) 213o.

1o6. Stumpf, W.E.
Endocrinology 85 (1969) 31.

1o7. Szego, C.M. und S. Roberts
J. Biol. Chem. 2o1 (1953) 21.

1o8. Szego, C.M. und S. Roberts
Rec. Proc. Horm. Res. 8 (1953) 419.

1o9. Talwar, G.P.
Int. J. Biochem. 3 (1972) 39.

11o. Talwar, G.P. und S.J. Segal
Proc. Natn. Acad. Sci. USA 5o (1963) 226.

111. Talwar, G.P., Segal, S.J., Evans, A. und O.W. Davidson
Proc. Natn. Acad. Sci. USA 52 (1964) 1o59.

112. Talwar, G.P., Sharma, S.K. und S.L. Gupta
J. Sci. Ind. Res. 27 (1968) 28.

113. Talwar, G.P., Sopori, M.L., Biswas, D.K. und S.J. Segal
Biochem. J. 1o7 (1968) 765.

114. Terenius, L.
Acta Endocr. 64 (197o) 47.

115. Toft, D. und J. Gorski
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 55 (1966) 1574.

116. Tucker, H., Larson, B. und J. Gorski
Endocrinology 89 (1971) 152.

117. Mc Guire,W.L.
J. Cli. Invest. 52 (1973) 73.

118. Mc Guire, W.L. und G.C. Chamness
In "Receptors for Reproduktive Hormones"
(B.W. O'Malley und A.R. Means, eds.)
(1973) Plenum, New York

119. Mc Guire, W.L. und J.A. Julian
Cancer Res. 31 (1971) 144o.

12o. Mc Guire, W.L., Julian, J. und G.C. Chamness
Endocrinology 89 (1971) 969.

121. Mc Guire, W.L., Huff, K., Jennings, A. und G.C. Chamness
Science 175 (1972) 335.

122. Mc Guire, W.L. und G.C. Chamness
"Studies on the Estrogen Receptor in Breast Cancer"
In "Receptors for Reproductive Hormones"
(B.W. O Malley, W.L. und A.R. Means, eds.)
(1973) Plenum Publish. Corp., New York

123. Tseng, L. und E. Gurpide
Endocrinology 94 (1974) 419.

124. Noyes, R.W., A.T. Hertig und J. Rock
Fertil. and Steril. 1 (195o) 3.

125. Brown, D.H.
Biochem. biophys. Acta (Amst.) 162 (1968) 152.

126. Parsons, D.F., Williams, G.R., Thompson, W., Wilson, D.
und B. Chance:
(Quagliariello, E., S. Papa, E.C. Slater und J.M.Tager,Hrsg.)
1967 S. 29, Adriatica Editrice Bari

127. Yago, N., S. Kobayashi, S. Sekiyama, H. Kurokowa, Y. Iwai,
J. Suzuki und S. Ichii:
J. Biochem. Tokyo 68 (197o) 775.

128. Dallner, G., Siekevitz, P. und G.E. Palade:
J. Cell Biol. 3o (1966) 73.

129. Zaffaroni, A. und R.B. Burton:
J. Biol. Chem. 193 (1951) 749.

13o. Lieberman, S., E.R. Katzenellenbogen, R. Schneider,
P.E. Studer und K. Dobriner:
J. Biol. Chem 2o5 (1953) 87.

131. Bücher, T., W. Lutz und D. Pelle:
Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handb. der Phsiol. Path. Chem. Analyse, lo. Aufl. Bd. 6A, 1964, S. 292, Springer Verlag Berlin.

132. Arrigoni, O. und T.P. Singer:
Nature (London) 193 (1962) 1256.

133. Mahler, H.R., G. Hübscher und H. Baum:
J. Biol. Chem. 216 (1955) 625.

134. Schnaitman, C., V.G. Erwin und J.W. Greenawalt:
J. Cell. Biol. 38 (1968) 158.

135. Leighton, F., B. Poole, H. Beaufay, P. Baudhin, J.W. Coffey, S. Fowler und L. De Duve:
J. Cell Biol. (1968 482.

136. Bergmeyer, H.U.:
In: Methoden d. enzym. Analyse
(1962) S. 752. Verlag Chemie, Weinheim.

137. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall:
J. Biol. Chem. 193 (1951) 265.

138. Burton, K.:
Biochem. J. 62 (1956) 315.

139. Ceriotti, G.:
J. Biol. Chem. 214 (1955) 59.

14o. Fawceff, D.W.:
J. nat. Cancer. Inst. Suppl. 5 (1955) 1475.

141. Palade, G.E. und P. Siekevitz:
J. Biophysic. Biochem. Cytol. 2 (1956) 671.

142. Jarabak, J., Seeds, A.E. und P. Talalay:
Biochemistry 5 (1966) 1269.

143. Pollow, K., Lübbert, H., Boquoi, E., Kreutzer, G., Jeske, R. und B. Pollow:
Acta endocrinologica 79 (1975) 134.

144. Dallner, G., Siekevitz, P. und G.E. Palade:
J. Cell Biol. 3o (1966) 73.
Ernster, L. und B. Kuylenstierna:
FEBS Symp. 17 (1968) 5.

145. James, F., Braunsberg, H., Irvine, W.T. und V.H.T. James:
Steroids 15 (1969) 669.

146. Geier, A., Horn, H., Lichtshtein, E., Levij, I.S. und M. Finkelstein:
Acta endocrinol. 75 (1975) 195.

147. Bleau, G., Roberts, K.D. und A. Chapdelaine:
J. clin. Endocr. 39 (1974) 236.

148. Siiteri, P.K., Ashby, R., Schwarz, B. und P.C.MacDonald:
J. Steroid Biochem. 3 (1972) 459.

149. Lehmann, W.D. und H. Breuer:
Hoppe-Seyler s Z. Physiol. Chem. 348 (1967) 1633.

150. Langer, L.J. und L.L. Engel:
J. Biol. Chem. 233 (1958) 583.

151. Langer, L.J., Alexander, J.A. und L.L. Engel:
J. Biol. Chem. 234 (1959) 26o9.

152. Karavolas, H.J., Baedecker, M.L. und L.L. Engel:
J. Biol. Chem. 245 (197o) 4948.

153. Karavolas, H.J. und L.L. Engel:
Endocrinology 88 (1971) 1165.

154. Liu, D.K. und C.D. Kochakian:
Steroids 19 (1972) 701.

155. Ball, P. und H. Breuer:
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351 (1970) 1011.

156. Lerner, N., Sulimovici, S. und B. Lunenfeld:
J. Steroid Biochem. 4 (1973) 193.

157. Inano, H. und B. Tamaoki:
Eur. J. Biochem. 44 (1974) 13

158. Stevenson, D. und C.D. Kochakian:
Endocrinology 95 (1974) 766.

159. Prechtel, K. und G. Rudzki:
Geburtsh. u. Frauenheilk. 33 (1973) 370.

160. Berberich, J. und R. Jaffé:
Z. Konst.-Lehre 10 (1924) 1.

161. Dieckmann, K.:
Virchows Arch. path. Anat. 256 (1925) 321.

162. Kleiss, E.:
Gegenbaurs morph. Jb. 104 (1963) 501.

163. Kückens, H.:
Z. Geburtsh. 96 (1929) 55.

164. Letterer, E.:
Ärztl. Wschr. 3 (1948) 230.

165. Luchsinger, J.C.:
Beitr. path. Anat. 78 (1927) 594.

166. Moskowicz, L.:
Arch. klin. Chir. 144 (1927) 138.

167. Polano, O.:
Z. Geburtsh. 87 (1924) 363.

168. Rosenburg, A.:
Frankf. Z. Path. 27 (1922) 466.

169. Sebening, W.:
Arch. klin. Chir. 134 (1925) 464.

17o. Tamagawa, J.:
Ref. Zbl. Gynäk. 5o (1925/26) 3246.

171. Horwitz, K.B. und W.L. McGuire:
Steroids Vol. 25, No. 4 (1975) 497.

172. Pollow, K.:
Habilitationsschrift aus d. Inst. für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin 1976.

7. Lebenslauf:

5. September 195o	Geboren in Berlin-Tiergarten als Sohn des Diplom-Volkswirtes Günter Baumann und der Ärztin Ursula Baumann, geb. Köller
Ostern 1957 bis Ostern 1963	Besuch der Zinnowald-Grundschule in Berlin Zehlendorf
April 1963	Übergang auf das Walther-Rathenau-Gymnasium in Berlin-Grunewald
12. Januar 197o	Reifeprüfung an der Walther-Rathenau-Oberschule
Frühjahr 197o	Zulassung zum Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
3. Juni 197o	Immatrikulation
15. März 1971	Vorphysikum
13. Juli 1972	Physikum
11. Februar 1976	Staatsexamen an der FU Berlin
September 1972 bis März 1976	Anfertigung der Dissertation im Institut für Molekularbiologie und Biochemie der FU Berlin unter Anleitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. Kunhard Pollow in der Arbeitsgruppe Sexualhormonforschung
Ab 1. April 1976	Medizinalassistent am Institut für Rechtsmedizin der FU Berlin

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Kunhard Pollow für die Überlassung des Dissertationsthemas, für stets gleichbleibende hilfreiche Unterstützung und viele wertvolle Hinweise bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Ernst Schütte, o. Prof., habe ich für Unterstützung und kritische Hinweise zu danken.

Fred Höpfner - Dissertationsdruck - 1 Berlin 12 - Pestalozzistraße 106
Tel.: 3128885 - 3138198